

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720081152573

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

环氧二烯 Mycoepoxydiene 在脂多糖诱导的  
炎症反应中的作用及机理研究

The role of Mycoepoxydiene in Lipopolysaccharide (LPS)  
induced inflammatory responses

陈 腾 辉

指导教师姓名: 俞春东 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月 24 日

论文答辩时间: 2011 年 5 月 28 日

学位授予日期: 2011 年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 摘要.....                             | I  |
| ABSTRACT.....                       | II |
| 第一章 前言 .....                        | 1  |
| 1.1 天然免疫 .....                      | 1  |
| 1.1.1 TLR 家族的发现 .....               | 1  |
| 1.1.2 TLR 家族成员 .....                | 2  |
| 1.1.2.1 TLR1, TLR2 和 TLR6 .....     | 2  |
| 1.1.2.2 TLR3 .....                  | 3  |
| 1.1.2.3 TLR4 .....                  | 3  |
| 1.1.2.4 TLR5 .....                  | 4  |
| 1.1.2.5 TLR7 和 TLR8 .....           | 5  |
| 1.1.2.6 TLR9 .....                  | 5  |
| 1.1.2.7 TLR11 .....                 | 7  |
| 1.1.3 TLR 的生理功能 .....               | 7  |
| 1.1.3.1 诱导机体炎症反应并产生炎症细胞因子 .....     | 7  |
| 1.1.3.2 抵抗病毒感染 .....                | 7  |
| 1.1.3.3 诱导一氧化氮 (NO) 产生的抑菌活性 .....   | 8  |
| 1.1.3.4 抗肿瘤活性及介导肿瘤治疗 .....          | 8  |
| 1.2 病原体 .....                       | 9  |
| 1.2.1 细菌 .....                      | 9  |
| 1.2.2 真菌 .....                      | 10 |
| 1.2.3 原生动物 .....                    | 11 |
| 1.2.4 病毒 .....                      | 11 |
| 1.3 LPS-TLR4 天然免疫信号通路 .....         | 12 |
| 1.3.1 LBP 和 CD14 .....              | 13 |
| 1.3.2 MD-2 .....                    | 14 |
| 1.3.3 其他适配蛋白(adaptor protein) ..... | 15 |
| 1.3.3.1 MyD88 依赖型信号通路 .....         | 15 |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.3.3.2 MyD88 非依赖型信号通路.....                         | 17        |
| 1.4 抗炎药物的研发及应用 .....                                | 19        |
| 1.5 本文立题背景、内容和意义 .....                              | 19        |
| <b>第二章 材料和方法 .....</b>                              | <b>21</b> |
| <b>2.1 材料 .....</b>                                 | <b>21</b> |
| 2.1.1 菌株、细胞与小鼠.....                                 | 21        |
| 2.1.1.1 菌株 .....                                    | 21        |
| 2.1.1.2 细胞 .....                                    | 21        |
| 2.1.1.3 小鼠 .....                                    | 21        |
| 2.1.2 主要试剂.....                                     | 21        |
| 2.1.3 主要仪器.....                                     | 23        |
| <b>2.2 方法 .....</b>                                 | <b>24</b> |
| 2.2.1 DNA 相关实验及方法.....                              | 24        |
| 2.2.1.1 大肠杆菌感受态细胞的 DNA 转化.....                      | 24        |
| 2.2.1.2 质粒 DNA 的提取 .....                            | 25        |
| 2.2.2 RNA 相关实验及方法 .....                             | 26        |
| 2.2.2.1 RNA 的提取.....                                | 26        |
| 2.2.2.2 反转录合成 cDNA.....                             | 26        |
| 2.2.2.3 实时荧光定量 PCR（Real-time PCR） .....             | 27        |
| 2.2.3 蛋白质相关实验及方法.....                               | 28        |
| 2.2.3.1 蛋白质样品制备 .....                               | 28        |
| 2.2.3.2 蛋白质浓度测定（BCA 法） .....                        | 28        |
| 2.2.3.3 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析 ..... | 28        |
| 2.2.4 细胞相关实验及方法.....                                | 30        |
| 2.2.4.1 细胞培养及传代.....                                | 30        |
| 2.2.4.2 细胞瞬时转染 .....                                | 30        |
| 2.2.4.3 细胞毒性实验（MTT 法） .....                         | 31        |
| 2.2.4.4 细胞荧光素酶活性检测 .....                            | 31        |
| 2.2.4.5 小鼠腹腔巨噬细胞的提取 .....                           | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.4.6 细胞核抽提 .....  | 32        |
| 2.2.4.7 胶迁移实验 (EMSA) .....   | 33        |
| 2.2.4.8 荧光共聚焦实验 .....  | 34        |
| 2.2.4.8 体外磷酸化实验 .....  | 35        |
| 2.2.5 动物相关实验及方法 .....  | 35        |
| 2.2.6 其他实验及方法 .....  | 36        |
| 2.2.6.1 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等细胞因子的测定 (ELISA 法) ..... | 36        |
| 2.2.6.2 NO 测定 (硝酸还原酶法) .....                                       | 36        |
| <b>第三章 结果与讨论 .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.1 实验结果 .....</b>  | <b>37</b> |
| 3.1.1 MED 对 RAW264.7 细胞没有毒性作用 .....                                | 37        |
| 3.1.2 MED 强烈抑制 LPS 诱导的前炎症因子分泌 .....                                | 38        |
| 3.1.3 MED 有效抑制不同浓度 LPS 刺激的前炎症因子分泌 .....                            | 39        |
| 3.1.4 MED 有效抑制 LPS 诱导的前炎症因子 mRNA 的表达 .....                         | 39        |
| 3.1.5 MED 明显抑制 LPS 诱导的 iNOS 及 NO 的表达 .....                         | 40        |
| 3.1.6 MED 明显抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 活性 .....                     | 41        |
| 3.1.7 MED 强烈抑制 LPS 诱导的 IKK 磷酸化及 I $\kappa$ B $\alpha$ 活性 .....     | 43        |
| 3.1.8 MED 有效抑制 LPS 诱导的 NF- $\kappa$ B 转运入核 .....                   | 44        |
| 3.1.9 MED 通过抑制 ERK 磷酸化来削弱 LPS 诱导的前炎症因子分泌 .....                     | 45        |
| 3.1.10 MED 对于 IKK $\beta$ 激酶活性没有影响 .....                           | 48        |
| 3.1.11 MED 有效抑制 LPS 引起的小鼠内毒素休克 .....                               | 52        |
| <b>3.2 分析与讨论 .....</b>   | <b>54</b> |
| <b>参考文献 .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>致谢 .....</b>  | <b>65</b> |

# CONTENTS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABSTRACT (CHINESE)</b> .....                                      | <b>I</b>  |
| <b>ABSTRACT (ENGLISH)</b> .....                                      | <b>II</b> |
| <b>1 INTRODUCTION</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 INNATE IMMUNITY</b> .....                                     | <b>1</b>  |
| 1.1.1 IDENTIFICATION OF TLR FAMILY .....                             | 1         |
| 1.1.2 TLR FAMILY MEMBERS .....                                       | 2         |
| 1.1.2.1 TLR1、TLR2 AND TLR6 .....                                     | 2         |
| 1.1.2.2 TLR3 .....   | 3         |
| 1.1.2.3 TLR4 .....   | 3         |
| 1.1.2.4 TLR5 .....   | 4         |
| 1.1.2.5 TLR7 AND TLR8.....   | 5         |
| 1.1.2.6 TLR9 .....   | 5         |
| 1.1.2.7 TLR11.....   | 7         |
| 1.1.3 PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF TLR .....                           | 7         |
| 1.1.3.1 INDUCES THE INFLAMMATION AND INFLAMMATORY<br>CYTOKINES ..... | 7         |
| 1.1.3.2 DEFENDS VIRAL INFECTION .....                                | 7         |
| 1.1.3.3 INITIATES THE ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF NO.....             | 8         |
| 1.1.3.4 DEFENDS TUMOR AND MEDIATES TUMOR THERAPY .....               | 8         |
| <b>1.2 PATHOGENS</b> .....   | <b>9</b>  |
| 1.2.1 BACTERIA.....  | 9         |
| 1.2.2 FUNGI .....  | 10        |
| 1.2.3 RPOTOOA .....  | 11        |
| 1.2.4 VIRUS.....   | 11        |
| <b>1.3 LPS-TLR4 MEDIATED INNATE IMMUNE SIGNALING PATHWAY</b> ...     | <b>12</b> |
| 1.3.1 LBP AND CD14 .....   | 13        |
| 1.3.2 MD-2.....  | 14        |
| 1.3.3 OTHER ADAPTOR PROTEIN .....                                    | 15        |
| 1.3.3.1 MyD88 DEPENDENT SIGNALING PATHWAY .....                      | 15        |
| 1.3.3.2 MyD88 DEPENDENT SIGNALING PATHWAY .....                      | 17        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.4 EXPLORATION AND APPLICATION OF ANTI-INFLAMMATORY DRUGS .....</b> | <b>19</b> |
| <b>1.5 BACKGROUND, CONTENT AND SIGNAFICANCE OF THIS THESIS</b>          | <b>19</b> |
| <b>2 MATERIALS AND METHODS .....</b>                                    | <b>21</b> |
| <b>2.1 MATERIALS .....</b>  | <b>21</b> |
| 2.1.1 STRAINS, CELLS AND MOUSES .....                                   | 21        |
| 2.1.1.1 STRAINS .....   | 21        |
| 2.1.1.2 CELLS .....   | 21        |
| 2.1.1.3 MOUSES .....  | 21        |
| 2.1.2 MAJOR REAGENTS .....  | 21        |
| 2.1.3 MAJOR EQUIPMENTS .....  | 23        |
| <b>2.2 METHODS .....</b>  | <b>24</b> |
| 2.2.1 DNA EXPERIMENTS .....   | 24        |
| 2.2.1.1 TRANSFORMATION OF COMPONENT CELLS .....                         | 24        |
| 2.2.1.2 PREPATATION OF PLASMIDS .....                                   | 24        |
| 2.2.2 RNA EXPERIMENTS .....   | 26        |
| 2.2.2.1 PREPARATION OF RNA .....  | 26        |
| 2.2.2.2 REVERSE TRANSCRIPTION .....                                     | 26        |
| 2.2.2.3 REAL-TIME PCR .....   | 27        |
| 2.2.3 PROTEIN EXPERIMENTS .....   | 28        |
| 2.2.3.1 PREPARATION OF PROTEIN SAMPLES .....                            | 28        |
| 2.2.3.2 MEASUREMENT OF PROTEIN CONCENTRATIONS .....                     | 28        |
| 2.2.3.3 SDS-PAGE AND WESTM BLOTTING .....                               | 28        |
| 2.2.4 CELL EXPERIMENTS .....  | 30        |
| 2.2.4.1 CELL CULTURE AND GENERATION .....                               | 30        |
| 2.2.4.2 TRANSIENT TRANSFECTION .....                                    | 30        |
| 2.2.4.3 CYTOTOXICITY TEST .....   | 31        |
| 2.2.4.4 MEASUREMENT OF LUCIFERASE ACTIVITY .....                        | 31        |
| 2.2.4.5 ISOLATION OF PERITONEAL MACROPHAGES .....                       | 32        |
| 2.2.4.6 NUCLEAR EXTRACTION .....  | 32        |
| 2.2.4.7 EMSA .....  | 33        |
| 2.2.4.8 IMMUNOFLURECENT ASSAY .....                                     | 34        |
| 2.2.4.9 IN VITRO KINASE ASSAY .....                                     | 35        |



|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.5 MOUSE EXPERIMENTS .....  | 35        |
| 2.2.6 OTHER EXPERIMENTS .....  | 36        |
| 2.2.6.1 MEASUREMENT OF TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 .....   | 36        |
| 2.2.6.2 MEASUREMENT OF NO .....  | 36        |
| <b>3.RESULTS AND DISCUSSION .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.1 RESULTS .....</b>   | <b>37</b> |
| 3.1.1 MED HAS NO TOXICITY ON RAW264.7 CELLS .....  | 37        |
| 3.1.2 MED STRONGLY INHIBITS LPS INDUCED PRO-INFLAMMATORY<br>CYTOKINES SECRETION .....                            | 38        |
| 3.1.3 MED EFFECTIVELY SUPPRESSES THE PRO-INFLAMMATORY<br>CYTOKINES EXPRESSIONS IN A LPS DOSE DEPENDENT MANNER .. | 39        |
| 3.1.4 MED SIGNIFICANTLY BLOCKS THE mRNA LEVELS OF<br>PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AFTER LPS TREATMENT .....        | 39        |
| 3.1.5 MED OBVIOUSLY REPRESSES LPS STIMULATED iNOS AND NO<br>EXPRESSION .....                                     | 40        |
| 3.1.6 MED EFFECTIVELY INHIBITS LPS INDUCED NF- $\kappa$ B ACTIVITY ..  | 41        |
| 3.1.7 MED STRONGLY REPRESSES LPS STIMULATED IKK<br>PHOSPHORYLATION AND I $\kappa$ B $\alpha$ ACTIVATION .....    | 43        |
| 3.1.8 MED SIGNIFICANTLY SUPPRESSES LPS INDUCED NF- $\kappa$ B<br>NUCLEAR TRANSLOCATION .....                     | 44        |
| 3.1.9 MED ATTENUATES LPS DERIVED PRO-INFLAMMATORY<br>CYTOKINES SECRETION BY IMPAIRING ERK ACTIVATION .....       | 45        |
| 3.1.10 MED HAS NO EFFECT ON THE KINASE ACTIVITY OF IKK $\beta$ ....  | 48        |
| 3.1.11 MED EFFECTIVELY ALLEVIATES LPS INDUCED ENDOTOXIC<br>SHOCK IN MICE .....                                   | 52        |
| <b>3.2 DISCUSSION .....</b>  | <b>54</b> |
| <b>4. REFERENCES .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>5. ACKNOWLEDGEMENT .....</b>  | <b>65</b> |

## 摘要

环氧二烯（MED）是海洋木栖真菌菜豆间坐壳菌（*Diaporthe phaseolorum*）的次级代谢产物，是一个以含有氧桥的八元环二烯为骨架的化合物，已有研究发现其具有很好的抗肿瘤活性，但是该化合物在炎症发生和发展过程当中的作用并不清楚，我们以脂多糖（LPS）为工具建立炎症反应模型，通过细胞水平以及动物水平实验来揭示 MED 在炎症反应发生过程中的保护作用。

首先我们通过细胞毒性试验来确定 MED 对于 RAW 264.7 细胞并无毒性。LPS 对机体刺激后会产生大量的炎症细胞因子，如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6，因此我们通过 LPS 和 MED 刺激细胞发现 MED 能有效的抑制前炎症因子的分泌，从而初步认为 MED 具有一定的抗炎效果。接着我们进一步研究了 MED 发挥其抗炎作用的机理，已知 LPS 通过 TLR4 受体激活细胞内的 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路，使得此信号通路上的激酶发生磷酸化以及 NF- $\kappa$ B 转运入核，从而激活细胞核中诸多炎症因子的表达，通过 Western Blot 实验我们发现 MED 对于 MAPK 中 ERK 信号通路具有明显的抑制作用，同时 MED 能够有效抑制 NF- $\kappa$ B 的转运入核以及其抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  的活性。基于细胞实验的结果，我们建立小鼠炎症反应模型，同样发现 MED 可以对 LPS 诱导的小鼠内毒素休克有较好的保护作用。

综上所述，MED 通过抑制炎症反应过程当中所激活的 ERK 和 NF- $\kappa$ B 通路，下调下游的前炎症因子的表达水平，从而有效的抑制炎症反应，发挥较为理想的抗炎活性。本研究为进一步将 MED 开发成为一种抗炎药物提供了一定的理论依据。

关键词：环氧二烯；炎症反应；抗炎药物

## Abstract

Mycoepoxydiene (MED) is a compound which was extracted from *Diaporthe phaseolorum* as a secondary metabolic product. Primary study has revealed that MED plays an obvious role in repressing cancer proliferation. However, it is still a puzzle about the function of MED in the process of inflammation. Therefore, we use lipopolysaccharide (LPS) to initiate the inflammatory responses and investigate the role of MED during these processes through cellular and animal experiments.

First of all, MED was assured to be not toxic to murine macrophage by MTT measurement. It is universally known that the organism would secret large mounts of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 after stimulation with LPS, therefore, we detected the secretion of these pro-inflammatory cytokines after the contemporary stimulation of LPS and MycoE and found that MycoE effectively attenuated the secretion of these cytokines by macrophages, these results suggested that MED may participate in the process of defending inflammatory responses. Secondary, the mechanism of MED plays its anti-inflammatory effect was further studied, LPS could bind to TLR4 to initiate MAPK and NF- $\kappa$ B pathways, when LPS and MED were added to the cells together, MED significantly suppressed the phosphorylation of ERK but not p38 and JNK, and MED could also inhibit the translocation of NF- $\kappa$ B from cytoplasm to nucleus as well as the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . Based on the results of the cell experiments, we used LPS to stimulate inflammation in mouse, and MED effectively alleviated the toxic shock caused by LPS as well.

In sum, MED inhibited the activation of ERK and NF- $\kappa$ B, downregulated the secretion of many inflammatory cytokines in the process of inflammation. MED, plays an impressive role in defending inflammatory responses, could be a potential candidate as an anti-inflammatory drug.

Key words: MED; inflammation; anti-inflammatory drug

## 第一章 前言

### 1.1 天然免疫

天然免疫系统是人体预防外界微生物感染的第一道防线。自从在果蝇上发现了针对 *Aspergillus fumigatus* 引发机体有效的免疫反应的蛋白 Toll<sup>[1]</sup>, 逐渐的积累了有关机体天然免疫系统识别外界微生物并介导自身免疫反应的证据。病原体偶联的分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP), 是微生物病原体分泌的被免疫系统识别的分子, 由于其只在微生物内而非在宿主内表达, 使它成为很好的免疫反应靶点, 排除机体自身免疫的危险。此外, PAMP 对于微生物存活的重要性以及在不同微生物之间结构的相对保守性, 使得免疫系统对于微生物 PAMP 的识别可以限制在相对较少数量的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 中<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.1 TLR 家族的发

Toll 蛋白最早是在研究果蝇胚胎发育的过程当中发现的, 它是一种 I 型的跨膜蛋白受体。在 20 世纪末, Toll 蛋白被发现不仅在果蝇胚胎发育中有作用, 而且是在果蝇抵抗真菌感染过程中发挥重要作用的一种受体, 由于果蝇只有天然免疫系统而不具备获得性免疫系统, Toll 蛋白被认为在果蝇天然免疫系统中发挥着重要作用。

在众多的模式识别受体 PRR 中间, 哺乳动物体内与果蝇体内 Toll 蛋白同源的 Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR), 在过去多年的研究里面被认为是机体天然免疫系统识别外界微生物的重要受体之一<sup>[3]</sup>。TLR 可以识别多种外界微生物对于机体的感染, 如细菌, 真菌及病毒。TLR 的发现经历了一个循序渐进但又快速发展的过程, 在鉴定出第一个哺乳动物 TLR 即 TLR4 后<sup>[4]</sup>, 许多不同的蛋白被鉴定具有与 TLR4 相近的结构或者功能并被归入到哺乳动物 TLR 家族当中<sup>[5]</sup>。哺乳动物中的 TLR 到现在为止已经被发现至少包括 11 个家族成员。每个 TLR 在识别不同的 PAMP 并受到诱导后, 能激发不同的细胞内信号通路并诱导有效的机体先天免疫反应, 如树突状细胞 (Dendritic cell, DC) 的成熟和细胞因子的

分泌，从而诱发机体的获得性免疫反应<sup>[3]</sup>。

TLR1-9 在小鼠和人之间体现了高度的保守性。而 TLR10，虽然人源 TLR10 蛋白被认为是有功能的，但是鼠源 *Tlr10* 基因的 C 末端可以被一条功能上不相关且无意义的序列代替，证明了鼠源 TLR10 蛋白的功能缺陷性。同样的，虽然鼠源 TLR11 蛋白被认为是有功能的，但是人源 *Tlr11* 基因中含有一个终止密码子表明了人源 TLR11 蛋白无法正确的编码表达<sup>[6]</sup>。

## 1.1.2 TLR 家族成员

### 1.1.2.1 TLR1, TLR2 和 TLR6

TLR2能够识别多种微生物产生的组分，包括由多种病原体产生的脂蛋白（lipoproteins）和脂多肽（lipopeptides），革兰氏阳性菌产生的肽聚糖（peptidoglycan）和脂膜酸（lipoteichoic acid），分支细菌产生的磷脂阿拉伯甘露聚糖（lipoarabinomannan），*Trypanosoma cruzi*产生的glycosylphosphatidylinositol 锚定物，*Staphylococcus aureus*分泌产生的酚溶性调控蛋白（phenol-soluble modulin），真菌产生的酵母多糖（zymosan），和*Treponema maltophilum*含有的糖脂（glycolipids）<sup>[7]</sup>。另外也有报道指出，TLR2能够识别由*Leptospira interrogans*，*Porphyromonas gingivalis* 和 *Helicobacter pylori*等对肠无感染性的细菌（non-entero-bacteria）产生的，与革兰氏阴性菌胞壁上含有的脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）不同的非典型性LPS，这种受TLR2识别的LPS在lipid A中的酰基链的数量上与受TLR4识别的LPS存在不同，从而导致了其在识别功能上的差异<sup>[3, 8]</sup>。但是由于现有的研究成果仍然存在一些争论，具体哪些类型的LPS受TLR2而非TLR4的识别需要进一步的研究和求证。

对于TLR2可以识别很广谱的微生物组分的作用机理，主要有两方面的研究解释。第一种解释认为是由于TLR2在结构上可以与其他TLR形成异源多聚体，如TLR1和TLR6，因为这两种TLR在结构上与TLR2具有很高的相近性。有研究表明，在敲除*Tlr6*基因后，从敲除小鼠身上提取的巨噬细胞对于来自支原体的双酰基脂多肽（diacyl lipopeptides）感染没有产生任何的炎症因子反应，但是同样的巨噬细胞对于来自革兰氏阴性菌的三酰基脂多肽（triacyl lipopeptides）感染表现出了正常的炎症因子反应<sup>[9]</sup>。相反，在敲除*Tlr1*基因后，从敲除小鼠身上提取的

巨噬细胞对于来自支原体的双酰基脂多肽（diacyl lipopeptides）感染产生正常强度的炎症因子反应，但是同样的巨噬细胞对于来自革兰氏阴性菌的三酰基脂多肽（triacyl lipopeptides）感染却表现出极弱的炎症因子反应<sup>[10]</sup>。由于双酰基脂多肽和三酰基脂多肽都已知能够被TLR2所识别，因此之前在TLR1和TLR6敲除小鼠中的实验结果说明，TLR1和TLR6是分别与TLR2结构上相互作用来选择对于双酰基脂多肽和三酰基脂多肽的感染产生不同的炎症反应。第二种解释主要针对的是TLR2能够识别真菌产生的组分<sup>[11]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖作为真菌细胞壁上的组分之一，可以结合植物凝血素受体家族成员之一，Dectin-1<sup>[12]</sup>。而TLR2则可以跟一系列与其功能上相关的受体如Dectin-1相互作用，从而借助这些受体来识别真菌感染，诱导TLR2介导的免疫信号通路激活。总之，TLR2能够通过借由许多或与其结构上相关的，或与其功能上紧密联系的受体，来识别许多微生物组分，从而达到识别外界病原体并诱导先天免疫反应的目的。

#### 1.1.2.2 TLR3

对于TLR3功能的研究，来自于对293细胞进行双链RNA（dsRNA）处理后没有任何的炎症反应，进而过表达TLR3后，发现293细胞对于dsRNA的反应明显增强，从而确定TLR3作为细胞表面一个识别外界dsRNA的受体传递免疫信号通路途径。此外，在小鼠实验中，发现在敲除*Tlr3*基因后，小鼠对于dsRNA感染产生的免疫反应也明显的减弱<sup>[13]</sup>，进一步证明了TLR3对于识别和介导dsRNA产生的炎症反应的重要性。

许多病毒在复制过程中产生dsRNA，并且dsRNA主要诱导细胞产生干扰素 $\alpha/\beta$ （interferon, IFN $\alpha/\beta$ ），这两种干扰素的产生均能够表现出极强的抗病毒和免疫活性，从而保护机体免遭外界病原体感染的伤害。因此，TLR3主要作用于对dsRNA和病毒感染的识别过程中，介导由其决定的免疫信号通路，但是细胞内同时也存在非TLR3依赖性的信号通路来识别dsRNA从而激活先天免疫反应。

#### 1.1.2.3 TLR4

在果蝇中成功鉴定了Toll蛋白并发现其在天然免疫系统中发挥着至关重要的作用之后一年，便在哺乳动物中发现了与Toll蛋白高度同源的TLR，而后在逐步发现TLR家族的其他成员之后，第一个发现的TLR被命名为TLR4<sup>[4]</sup>。作为最早

被鉴定出来的TLR，TLR4受到了广泛的关注，对于其功能的研究也已经开展的非常深入。在小鼠身上表达*Tlr4*突变的基因后，发现突变型小鼠对于TLR4配体LPS的免疫反应明显减弱<sup>[14]</sup>。

TLR4除了对LPS具有很强的识别能力外，还对从*Taxus brevifolia*的树皮中分离出来的二萜化合物紫杉酚具有很强的识别作用<sup>[15, 16]</sup>，另外，TLR4还被发现在细胞内存在着多种天然配体，如热休克蛋白60和70（heat shock proteins, HSP60 and HSP70），纤连蛋白的额外结构域A（extra domain A），透明质酸，硫酸乙酰肝素和纤维蛋白原中的多糖（oligosaccharide）。但是同LPS在很低浓度就能识别并激活TLR4不同，这种内源存在的天然配体需要在很高的浓度下才能够激活TLR4。另外也有研究发现在制备HSP70的时候，如果有LPS的污染，也能够大大增强其对于TLR4的激活作用<sup>[17]</sup>，说明这些配体可以一起作用于TLR4并不会相互干扰。但是，正是由于TLR4对于LPS极强的识别作用，LPS在极低的浓度下便可以激活TLR4并表现出它的免疫激活能力，因此在研究探索TLR4的内源配体过程中，要额外的注意样品的纯度，因为即使是混入了极低浓度的LPS，也会对实验结论的可靠性产生很大的影响。

#### 1.1.2.4 TLR5

TLR5主要识别的是由细菌鞭毛产生的特殊鞭毛蛋白<sup>[18]</sup>。在CHO细胞中过量的表达人源TLR5后，发现细胞对于鞭毛蛋白的反应敏感性明显增强，说明了TLR5在介导鞭毛蛋白产生机体先天免疫反应过程中的重要作用。除此之外，TLR5还被发现能通过其与鞭毛蛋白之间的相互作用，而结合鞭毛蛋白上面一个在进化上相对保守的结构域<sup>[19]</sup>。另有报道发现TLR5主要在小肠上皮细胞的底面而非在上表面表达，表明TLR5是作为病原体在小肠内感染小肠上皮细胞的主要感受器之一，在小肠内的天然免疫系统中，TLR5扮演着识别肠内病原体的重要角色<sup>[20]</sup>。

鞭毛蛋白作为TLR5的配体，也被发现能够激发肺上皮细胞的炎症反应而产生炎症细胞因子<sup>[21]</sup>。这一系列的研究发现都表明了TLR5在粘膜表面表达并在识别细菌感染过程中扮演的重要角色。同时，TLR5的配体结合区域存在着氨基酸多态性，当其配体结合区域氨基酸出现终止密码子而使机体无法正常表达TLR5时，机体对于细菌*Legionella pneumophila*的鞭毛上的鞭毛蛋白的反应敏感

性显著降低<sup>[21]</sup>。

### 1.1.2.5 TLR7 和 TLR8

TLR7和TLR8是在结构上高度保守且相似的受体蛋白，并且在某些特定的情况下，它们可以识别一样的配体。在利用*Tlr7*基因敲除小鼠进行的实验中，发现TLR7可以有效的识别一种合成的化合物imidazoquinolines，这种化合物现在已经被用于抗病毒的临床治疗当中<sup>[22]</sup>，由此说明TLR7在介导病毒干扰的免疫反应过程中的重要作用。虽然TLR7和TLR8在结构上具有很高的相似度，人源TLR7和鼠源TLR7均可以识别imidazoquinolines，而人源TLR8也同样可以识别imidazoquinolines，但是研究发现鼠源TLR8却没法识别imidazoquinolines<sup>[23]</sup>，这说明TLR7和TLR8在具体识别各自的配体过程中，还是有不同的选择性而非完全一致。同时，TLR7也能够识别罗唑利宾（loxoribine），这种化合物具有抗病毒和抗肿瘤的双重活性<sup>[24]</sup>。

以上提到的两种合成类化合物imidazoquinolines和loxoribine是在结构上都很接近的鸟嘌呤腺苷类核酸物质，因此便有假设认为TLR7和人源TLR8主要通过识别病毒上的核苷酸类似序列来介导病毒感染引起的免疫反应。之后的研究也证明了前面假设的准确性，发现TLR7和人源TLR8能够识别富含鸟嘌呤腺苷和尿嘧啶腺苷的单链RNA（ssRNA）病毒，如人免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus），疱疹性口炎病毒（vesicular stomatitis virus）和流感病毒（influenza virus）<sup>[25, 26]</sup>。虽然宿主体内也会存在大量的ssRNA，但是这些ssRNA并不会被机体自身的TLR7和TLR8所识别而产生免疫反应，可能的原因是TLR7和TLR8主要在细胞的内涵体中表达，而ssRNA一般不会被运输到内涵体中，从而避免了与TLR7和TLR8的直接接触。

### 1.1.2.6 TLR9

细菌中含有非甲基化CpG结构域的DNA，也能够激活机体的天然免疫系统。最近几年的研究表明，在真核生物中，细菌DNA中的CpG结构域的密度在不断的减少，同时CpG结构域中半胱氨酸的甲基化程度越来越高，导致细菌DNA通过CpG结构域引起机体免疫反应的有效性逐渐降低。而通过小鼠实验发现，CpG是TLR9的主要配体，CpG主要通过受到TLR9的识别而激活机体的先天免疫反应



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库